Aus der Kieferchirurgischen Universitätsklinik und
Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr.Dr. J. Reuther

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON FLAVICHROMIN AUF DIE HEILUNG KÜNSTLICHER KNOCHENDEFEKTE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Claus Neckel
aus Schweinsdorf

Würzburg, den 12.03.1982

Aus der Kieferchirurgischen Universitätsklinik und
Poliklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr.Dr. J. Reuther

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON FLAVICHROMIN AUF DIE HEILUNG KÜNSTLICHER KNOCHENDEFEKTE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Claus Neckel
aus Schweinsdorf

Würzburg, den 12.03.1982

Referent: Prof. Dr.Dr. F. Schröder

Korreferent: Prof. Dr. G. Schargus

Dekan: Prof. Dr. K.-A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 19.7.82

UNIV. LEIDEN HBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON FLAVICHROMIN AUF DIE HEILUNG KÜNSTLICHER KNOCHENDEFEKTE

Seite

I. EINLEITUNG 2

II. KNOCHENHEILUNG 3

III. METHODIK 7

1. Tiere
2. Fütterung
3. Operation
4. Gruppeneinteilung und Flavichromin-Dosierung
5. Intravitalfärbung und Versuchsdauer
6. Histologische Aufbereitung

IV. ERGEBNISSE 13

1. Allgemeine Entwicklung der Tiere
2. Histologische Ergebnisse

V. DISKUSSION 40

VI. ZUSAMMENFASSUNG 46

VII. LITERATURVERZEICHNIS 47

I. EINLEITUNG

Wegen der in den letzten Jahren erheblich durch Verkehrsunfälle gestiegenen Zahl an Kieferbrüchen muß aus ökonomischen und psycho-sozialen Gründen eine Kürzung der Rehabilitationszeit der Patienten angestrebt werden.

Um eine Beschleunigung der Knochenheilung zu erreichen, verabreichten wir Flavichromin und untersuchten den Einfluß des Pharmakons Flavichromin, einem anabolen Wirkstoff, auf die Knochenregeneration. Um den Einfluß der Mobilität der Fragmentenden auf die Ossifikation zu vermeiden, den ANDERSON in seiner Arbeit über die stabile Osteosynthese herausarbeitete, setzten wir, wie HERREINER und BILLO angaben, nur einen Knochendefekt im Bereich des Femur von Meerschweinchen.

Das Kalzifizierungsverhalten des Ersatzgewebes wurde histologisch durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Bei dem Präparat Flavichromin handelt es sich um ein Dehydrierungspolymerisat von p-Hydroxyzimtalkohol, einem Chinonderivat. Der Dosierungsbereich des Medikamentes wird als groß angegeben, da es bereits im Dosierungsbereich unter einem µg nachweisbar ist (SEUFERT), und es auch in großen Dosen im Grammbereich nicht toxisch sein soll.

II. KNOCHENHEILUNG

Der normale Heilungsprozeß einer Knochenwunde erfolgt nach EDER in folgenden Schritten:

1. Bildung eines Frakturspalthämatoms
2. Ersatz des Hämatoms durch Granulationsgewebe (bindegewebiger Kallus)
3. Auswachsen von Mesenchymzellen aus dem benachbarten Peri- und Endost unter Bildung eines knorpligen Kallus
4. Auftreten von Riesenzellen mit Verkalkung des Ersatzgewebes (provisorischer Kallus)
5. Langsamer Umbau in lamellären Knochen

Nach WILLENEGER kann man bereits nach ca. drei bis fünf Tagen im Defektbereich osteoides Gewebe nachweisen. KRÜGER gibt dagegen zur Heilungszeit bei gleicher Phaseneinteilung wie EDER an, das Hämatom bleibe bis zu sechs Tagen und der bindegewebige Kallus bis zu ca. zwölf Tagen unverändert erhalten. Der darauffolgende knorplige Kallus ist nach drei Wochen nach dem Trauma nachweisbar. Der provisorische Kallus entsteht zwischen der dritten mit vierten Woche. HOAGLUND et al. zeigen auf, daß der Umbau des langsam entstehenden lamellären Knochens bis zu drei Jahren andauern kann, wobei jedoch der Knochen im Kiefergesichtsbereich klinisch nach ca. sechs Wochen fest und belastbar ist.

ABERCROMBIE beschrieb 1964 den positiven Einfluß von "wound hormones", die sowohl bei Weichteil- wie auch bei Knochenwunden zu einer Erhöhung der Mito-

serate der Fibroblasten führen. Da er diesen Hormonkomplex jedoch nicht isolieren konnte, gibt es noch keine klinischen Beweise dafür.

Tierexperimentell konnten DUTHIE und BARKER 1955 eine Akkumulation von Mastzellen 48 Stunden nach dem Trauma im Frakturbereich nachweisen. Die Mastzellenpopulation blieb über weitere sieben Tage bestehen. Sie nahmen an, daß Mastzellen mit ihren zelleigenen Gewebshormonen zu einer Beschleunigung der Phase des bindegewebigen Kallus führen. Sie untersuchten deshalb vergleichend die Frakturheilung bei parenteraler und lokaler Gabe von Mastzellenextrakten und konnten in allen Fällen eine beschleunigte Frakturheilung erzielen.

LEXER wies bereits 1924 bei konservativ versorgten Extremitätenfrakturen auf die hohe osteogene Potenz des Peri- und Endostes hin. FRENG unterstrich diese Ansicht durch eine Arbeit, in der er histologisch das knöcherne Ersatzgewebe nach subperiostaler Resektion im Bereich des harten Gaumens zur Operation einer Chonanalatresie untersuchen konnte. BASSET et al. wiesen nach, daß bei in vitro Versuchen der Einfluß der Sauerstoffversorgung auf die Differenzierung des bindegewebigen Kallus bei guter Vaskularisierung zum provisorischen Anteil an Chondroblasten bei weitem überwog.

1962 vertrat BASSET in seiner grundlegenden Arbeit über die Knochenheilung die Auffassung, daß die rein angiogene Ossifikation wegen der besseren Sauerstoffversorgung aus den eröffneten Haverschen Ka-

nälen den peri- und endostalen Anteil der knöchernen Regeneration bei weitem überwiegt. Die rein angiogene oder auch primäre Knochenheilung wurde bereits 1958 von BAGBY und JANES in der ersten Arbeit über die Kompressionsplattenosteosynthese beschrieben. Später wiesen auch MÜLLER et al. sowie ANDERSON auf die absolut kallusfreie Ossifikation hin, ANDERSON forderte jedoch hierfür auch bei Funktionsstabilität der Osteosynthese eine völlige Ruhigstellung der Bruchenden.

Weitere wesentliche Faktoren, die die Knochenbruchheilung beeinflussen, sind externe Einflüsse, wie Ernährung und Allgemeinerkrankungen des Patienten. Da diese Faktoren einfacher zu variieren sind als die Grundvorgänge der Knochenheilung, haben hier viele Wissenschaftler ihre Forschung angesetzt.

Bereits 1932 stellten MC KEOWN et al. fest, daß nach fettreicher Diät die Knochenheilung schneller, jedoch auf Kosten der Knochenhärte abläuft.

Bei Untersuchungen von Weichgewebsdefekten wiesen CLARK et al., MULHOLLAND et al. sowie HARVEY und HOWES nach, daß der Eiweißgehalt der Nahrung in positiver Korrelation zur Wundheilung steht. Sie führten dies auf eine beschleunigte Fibroblastenproliferation zurück. In Anlehnung an diese Arbeiten wiesen HERREINER histologisch und BILLO im Profilscanner an künstlichen Knochendefekten vom Meerschweinchen nach, daß bei einer hochkonzentrierten Eiweißdiät eine Beschleunigung der Knochenwundheilung zu erzielen ist.

SCHOTT et al. unterstrichen klinisch die Beschleunigung der Knochenheilung durch eine eiweißreiche Ernährung.

Neben den diätischen Anstrengungen zur Beschleunigung der Knochenheilung zeigten BAGBY und JANES mit Hilfe der Kompressionsplattenosteosynthese eine frühzeitige Funktionsstabilität auf. MÜLLER et al. und auch ANDERSON verbesserten diese Operationsmethoden später. Sie zeigten dabei, daß die Kallusbildung in direkter Abhängigkeit von der Mobilität der Fragmentenden steht. ANDERSON postulierte, daß nach Druckvereinigung und absoluter Ruhigstellung der Bruchstücke eine kallusfreie Heilung auftrete. Er fordert jedoch eine möglichst frühzeitige Mobilisation, um einen funktionellen Umbau des Ersatzgewebes zu erzielen. Dabei gibt er eine leichte Kallusbildung an.

RICHTER et al. gaben eine Methode an, bei der sie zur Verklebung der Fragmentenden durch eine Kittsubstanz Ultraschall verwandten und dabei eine funktionsstabile Knochenvereinigung ohne zusätzliche interne oder externe Fixationsmittel beobachteten.

III. METHODIK

1. Tiere

Der Versuch wurde an einhundert Albino-Meerschweinchen durchgeführt, die ein durchschnittliches Anfangsgewicht von 780 g hatten.

Die Tiere waren in Einzelkäfigen aus Makrolon mit verzinkten Drahtdeckeln in einem Raum mit konstanter Temperatur von $\pm$ 2° C und Luftfeuchtigkeit zwischen 50 % und 60 % untergebracht.

Da der Tierstall keine Fenster besaß, mußte ein künstlicher Tag-Nachtrhythmus mit Hilfe eines Zwölf-Stunden-Lichtautomaten aufrecht erhalten werden.

2. Fütterung

Die Tiere erhielten eine Standarddiät bestehend aus gepreßtem Trockenfutter der folgenden Zusammensetzung:

20 % Eiweißkonzentrat
- davon: 40 % Sojaschrot
- 25 % Weizenkeime
- 20 % Dorschmehl
- 10 % distillers solubles
- 5 % Süßmolkenpulver

40 % Luzernegrünmehl
16 % Getreideschrote
davon: 30 % Mais
30 % Weizen
26 % Gerste
14 % Hafer
8 % Haferflocken
6 % Rübenschnitzel
5 % Weizenfuttermehl
2 % Melasse
0,36 % Vitaminkonzentrat (1000 mg Vitamin C/kg)
2,64 % Mineralstoffmischung

Zur Deckung des Flüssigkeitsbedarfs erhielten die Meerschweinchen Leitungswasser aus Nuckelflaschen.

3. Operation

24 Stunden vor der Operation wurde den Tieren das Futter entzogen, um eine mögliche Aspiration während des Eingriffes zu vermeiden. Zur Prämedikation verabreichten wir 0,2 ml/100 g KG Rompun^{R} (= 2- (2,6- Xylidino)- 5,6- dihydro- 4 H- 1,3 thiazin-hydrochlorid = Xylazin) intramuskulär. Dafür mischten wir das Medikament mit Aqua destillata per injectionem im Verhältnis 1 : 9.

Die endgültige Narkose wurde mit Nembutal^{R}

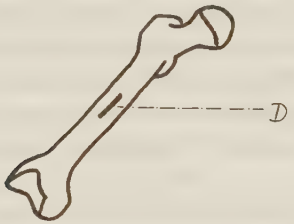
durchgeführt. Der Wirkstoff dieses Medikaments ist das 5- Äthyl- 5 (1- methy-butyl) barbitursaure Natrium. Wir instillierten dieses Mittel im Verhältnis 1 : 4, verdünnt mit Aqua destillata per injectionem intraperitoneal.

Das Operationsgebiet an der Außenseite des linken Oberschenkels wurde rasiert und mit Bariumsulfat enthaart. Das Tier wurde anschließend auf einem speziellen Operationstisch fixiert und mit gefärbtem Dibromol^{R} desinfiziert.

Die Operation wurde unter streng sterilen Kautellen durchgeführt. Nachdem wir das Tier steril abgedeckt hatten, wurden die Haut, der Muskel und das Periost scharf mit dem Skalpell durchtrennt, mit dem Rasparatorium die Knochenhaut nach beiden Seiten hin abgelöst und der Schaft des Femur in seiner longitudinalen Ausdehnung freigelegt.

Unter dauernder Spülung mit physiologischer NaCl-Lösung setzten wir mit einem zahnärztlichen Fissurenbohrer der Größe 1 einen Knochendefekt in der Längsachse des Knochens von 5 x 1 mm. Dabei wurde die Fissur möglichst in der zentralen Region des Femurschaftes gesetzt, um die Möglichkeit einer spontanen Fraktur so gering wie möglich zu halten (Schema 1). Nach abschließender Reinigung der Operationshöhle mit physiologischer Kochsalzlösung streuten wir Nebacetin^{R} in die Wunde.

Der Wundverschluß erfolgte mehrschichtig durch eine Muskelfasziennaht mit Cat-Gut^{R} und einer Hauteinzelknopfnaht aus Seide. Auf die Cutis wurde Liquidoplast^{R} gesprüht. Dann kamen die Tiere wieder in ihre Käfige.



Schema 1: Femur mit Knochendefekt (D)

4. Gruppeneinteilung und Flavichromin-Dosierung

Das Tierkollektiv von 100 Meerschweinchen teilten wir in vier Gruppen à 25 Tiere ein:

Gruppe I : Kontrollgruppe
Gruppe II : NaCl-Gruppe
Gruppe III: Flavichromin-Gruppe mit 1 µg Tagesdosis
Gruppe IV : Flavichromin-Gruppe mit 10 µg Tagesdosis

Flavichromin, wie auch die Kochsalzlösung, wurde intramuskulär verabfolgt. Da die täglich intramuskuläre Gabe, wenn auch jeweils nur in

Flüssigkeitsmengen von ca. 0,8 ml, ein erhebliches körperliches und seelisches Trauma für die Tiere darstellte, applizierten wir neben unseren Kontrollen (Nullgruppe = Gruppe I) einer Vergleichsgruppe nur physiologische Kochsalzlösung, um den Effekt des Spritzentraumas zu beobachten.

Das Flavichromin und die Natriumchloridlösung wurden vom ersten postoperativen Tag an täglich bis zum Versuchsende injiziert. Um eine möglichst reproduzierbare und gleichmäßige Tagesdosisprofilkurve zu erhalten, verabreichten wir die Mittel täglich um 15^{00} h $\pm$ 2 h.

5. Intravitalfärbung und Versuchsdauer

Zum histologischen Nachweis des zeitlichen Verkalkungsverhaltens des Knochens injizierten wir intravital Fluoreszenzfarbstoffe und zwar nach folgendem Schema:

1. postoperative Woche	---
2. p.o.W.	---
3. p.o.W.	Reverin
4. p.o.W.	Alizarin
5. p.o.W.	Xylenolorange
6. p.o.W.	Calcein
7. p.o.W.	Calceinblau
8. p.o.W.	Reverin
9. p.o.W.	Xylenolorange

Am ersten Tage nach der letzten Gabe des Xylenolorange, d. h. in der zehnten postoperativen Woche, töteten wir die Tiere durch eine Curareinjektion.

Der Femur wurde unter Schonung des Periostes freipräpariert und anschließend zur histologischen Untersuchung vorbereitet.

6. Histologische Aufbereitung

Der freipräparierte Knochen wurde in 40 %igem Alkohol mit 0,5 % basischem Fuchsin fixiert und im Stück in aufsteigender Alkoholreihe mit basischem Fuchsin gefärbt. Anschließend entfetteten wir den Knochen mit Xylol (SCHENK).

Eingebettet wurde der Femur in einem Methyl-Methacrylatgemisch, das wir grundsätzlich nach der von DELLING angegebenen Methode zubereiteten, jedoch in Bezug auf den Weichmacher modifizierten (HESS et al.). Der unentkalkte und eingebettete Knochen wurde mit einer von der Firma Leitz hergestellten Innenlochsäge quer zur Knochenlängsachse in Präparate von 80 bis 100 µ Dicke geschnitten.

Die histologische Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop Orthoplan (Leitz).

IV. ERGEBNISSE

1. Allgemeine Entwicklung der Tiere

Ausgehend von einem durchschnittlichen Anfangsgewicht von 780 g zu Beginn des Versuchs konnte eine mittlere Zunahme auf 941 g verzeichnet werden. Die Extremwerte lagen dabei minimal bei 709 g und maximal bei 1138. Beim Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander ergab sich bei der prozentualen Gewichtszunahme folgendes Resultat:

Gruppen-Nr.	Dosierungsart	Gewichtszuwachs in %
I	Kontrolle	+ 24,07
II	NaCl	+ 17,22
III	1 µg Flavichromin	+ 21,47
IV	10 µg Flavichromin	+ 22,74
Insgesamt		+ 20,64

Tabelle 1

2. Histologische Ergebnisse

2.1. Die Tiere der Gruppe I (Kontrollgruppe)

3. Woche:

Nach drei Wochen wird das Ersatzgewebe im Defektbereich mineralisiert (Bild 1). Man erkennt dabei gelbliche Faserknochenformationen, die regellos von Gefäßen durchdrungen werden.

Subperiostal beginnt eine deutliche Kallusbildung (Bild 2). Dabei erstreckt sich diese Kallusformation weit über den devitalen Knochenbereich auf den gesunden Röhrenknochen. Die größte Dicke erreicht der Faserknochenkallus im Bereich der resorbierten Kortikalis am Osteotomiespaltrand.

6. Woche:

Im Defektbereich kann man perivaskulär in der sechsten bis achten Woche geringe lamelläre Knochenablagerungen erkennen (Bild 3).

Subperiostal von lateral schiebt sich ein grünfluoreszierendes Band lamellären Knochens auf den Stützkallus, ohne ihn jedoch in der gesamten Ausdehnung des Defektes zu überziehen (Bild 4).

Der ursprüngliche Röhrenknochen zeigt im Osteotomiebereich deutliche, devitale Randzonen (Bild 5), die in manchen Fällen eine erhebliche Breite aufweisen. Man kann in diesem Bereich leere Zellvakuolen erkennen. Revitalisierungsvorgänge in dem toten Knochen können ab der sechsten Woche beobachtet werden. Es zeigt sich dabei, daß das devitale Areal von Gefäßen durchdrungen wird, die eine perivaskuläre Knochenneubildung mit Kalkablagerungen konzentrisch um das Gefäß herum aufweisen.

10. Woche:

Die makroskopische und mikroskopische Übersicht zeigt bei allen Präparaten nach der zehnten Woche einen sich klar abgrenzenden Defektbereich. Man erkennt, daß das Ersatzgewebe im Osteotomiespalt eine stärkere Fuchsineinlagerung aufweist. Die Osteotomiegrenzen sind scharf erkennbar. Das Ersatzgewebe füllt die gesamte Breite des Defektes aus, erreicht jedoch in seiner Dikke in keinem Fall die Röhrendicke des Knochens.

An der Außenfläche ist in den meisten Fällen nur eine leichte Eindellung der Knochenoberfläche zu sehen, während vom Lumen des Röhrenknochens her in keinem Fall eine scharfe Demarkierung nachzuweisen ist. Hier zieht das Knochenmark zum Teil tief in den

Defekt hinein und weist einen unregelmäßig begrenzten Übergang zum Ersatzgewebe auf (Bild 6).

In einigen Präparaten sieht man im Defektbereich noch nicht organisierte Hämatome, die von neugebildetem Knochen umgeben sind (Bild 7).

Subperiostal und endostal erkennt man starke Resorptionen des Lagerknochens, dabei werden die scharf auslaufenden Osteotomieränder abgeflacht. Die Resorptionserscheinungen sind subperiostal wesentlich stärker ausgeprägt als endostal.

Nach der zehnten Woche ist ein kleiner Teil dieses devitalen Knochens im Randzonenbereich revitalisiert.

Nach zehn Wochen ist erst ein relativ kleiner Anteil des Ersatzknochens lamellär umgeformt, die Masse des neugebildeten Knochens auf den Bildern ist noch diffus gelb gefärbt und dadurch als Faserknochen erkennbar.

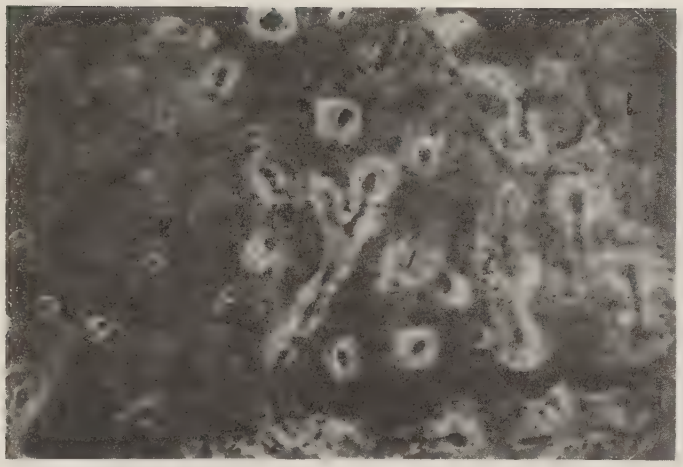


Bild 1: Subperiostale Resorptionszone (Z), Lagerknochen (L), Kallusgewebe (K)
(Vergrößerung: 77fach)

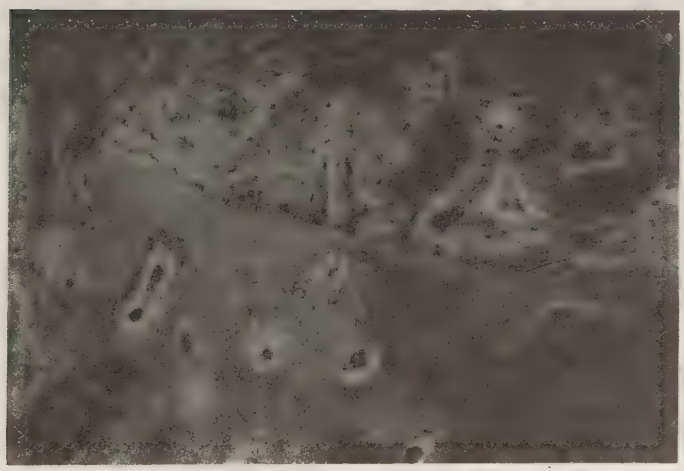


Bild 2: Subperiostaler Kallus (100fach)

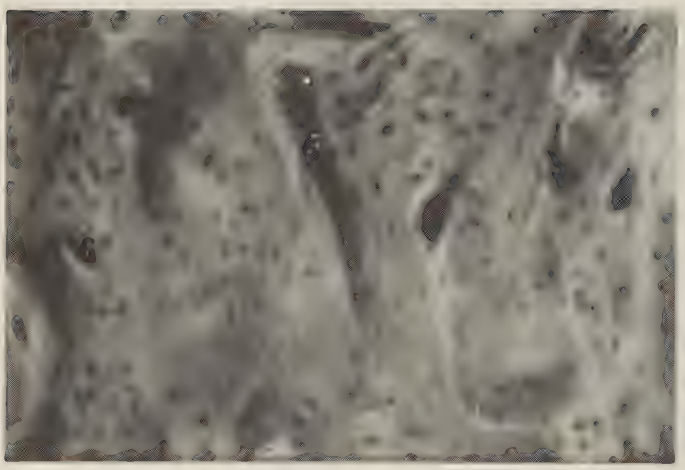


Bild 3: Geringe perivaskuläre Ossifikation
G: Gefäß (155fach)

Bild 4: Bandförmige Ossifikation, subperiostal
(L) (120fach)

Bild 5: Deutliche, devitale Randzone mit leeren Zellvakuolen (Z) (100fach)

Bild 6: Übersicht des Ersatzgewebes (E) in Lagerknochen (L), M: Markraum (62fach)

Bild 7: Zentrum des Hämatoms (H) (62fach)

2.2. Die Tiere der Gruppe II

3. Woche:

Nach drei Wochen beginnt subperiostal eine Stützkallusbildung, die weit über den devitalen Knochenbereich auf das Areal des gesunden Lagerknochens übergreift. Es handelt sich dabei um einen unregelmäßig aufgebauten Faserknochen (Bild 8).

Das Ersatzgewebe im Defektbereich wird mineralisiert. Man erkennt diffus angeordneten gelben Faserknochen, der zudem große rotfluoreszierende Anteile aufweist. Ein großer Teil des Ersatzgewebes scheint also erst nach der vierten Woche mineralisiert zu werden (Bild 9).

6. Woche:

Nach sechs Wochen zieht vom gesunden Knochen ein schmales, lamelläres, grünes Band auf den Stützkallus zur Defektmitte hin. Dieses Band überdeckt jedoch nicht den gesamten Defektbereich.

8. Woche:

Eingebettet in diesen Faserknochen des Defektersatzgewebes sind unregelmäßig verteilte Gefäße, die perivaskulär nach sechs bis acht Wochen konzentrische Kalksalzab-

lagerungen zeigen. Von endostal erkennt man nach sechs Wochen eine erste Tendenz der Knochenneubildung, wie an der diffusen Geflechtknochenbildung im Übergangszonenbereich im Lumen angrenzenden Knochenbezirk zu sehen ist (Bild 10).

10. Woche:

Bei der Übersichtseinstellung und der makroskopischen Inspektion erkennt man nach zehn Wochen am quer zur Längsachse geschnittenen Knochen deutlich den hyperchromen Defektbereich. Auch in dieser Gruppe ist der Übergangsbereich von Röhrenknochen zum Ersatzgewebe noch klar demarkiert. Das Ersatzgewebe füllt den Defekt in seiner ganzen Breite aus, ohne die Manteldicke des Knochens auch nur annähernd zu erreichen. Subperiostal sieht man noch eine leichte Eindellung der Oberfläche, während vom Röhrenlumen her eine deutliche Defektnische besteht (Bild 11).

Der Defektrand zeigt wiederum devitalen Knochen mit leeren Zellvakuolen. Man erkennt auch in dieser Gruppe neugebildete Gefäße, die durch den toten Knochen ziehen und nach acht Wochen eine Kalksalzablagerung aufweisen. Die Dichte der Gefäße im devitalen Os scheint geringer zu sein als bei der Gruppe I (Bild 12).

Die subperiostalen, randständigen Resorptionen am Lagerknochen mit einwachsenden Gefäßen in den zum Teil devitalen Knochen sind wiederum wesentlich stärker ausgeprägt als im endostalen Bereich (Bild 13).

Insgesamt erkennt man ein gelb-rotes Defektersatzgewebe vom Charakter des Faserknochens das relativ schlecht vaskularisiert ist. Die perivaskuläre und subperiostale bzw. endostale Lamellenknochenbildung ist auch nach zehn Wochen schwach ausgeprägt. Nur feine, fluoreszierende Bänder sind zu erkennen. Die Revitalisierung im Bereich des devitalisierten Knochens geht sehr langsam vor sich.

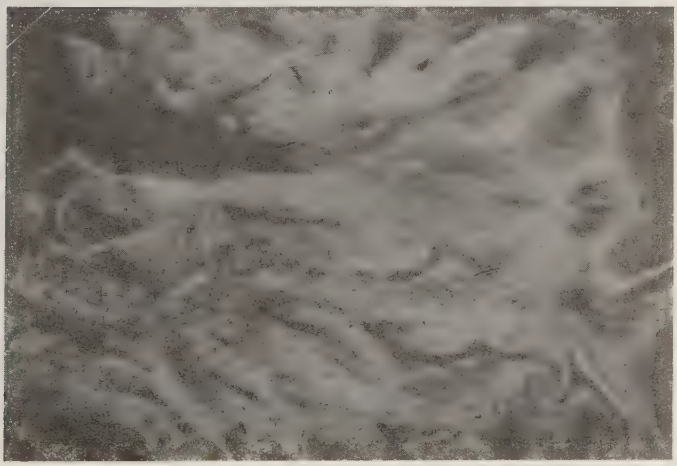


Bild 8: Ersatzgewebe (87fach)

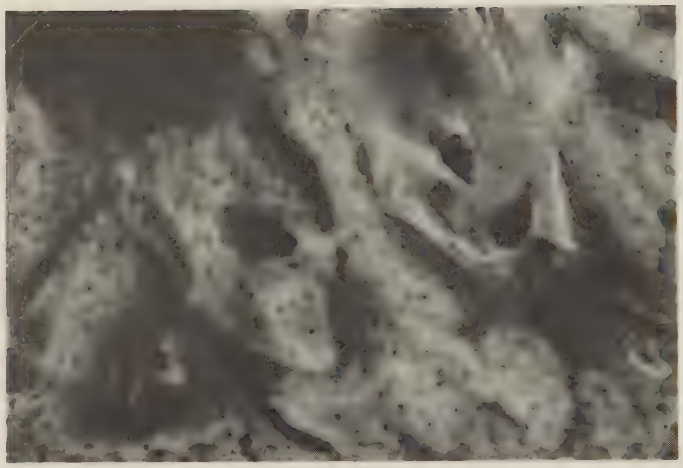


Bild 9: Ersatzgewebe zeigt einen Großteil der Mineralsalzablagerung ab der vierten Woche (rot) (105fach)

Bild 10: Endostale Abgrenzung beginnt ab der sechsten Woche (87fach)

Bild 11: Übersicht der Gruppe II: (48fach)
E: Ersatzgewebe L: Lagerknochen
M: Mark

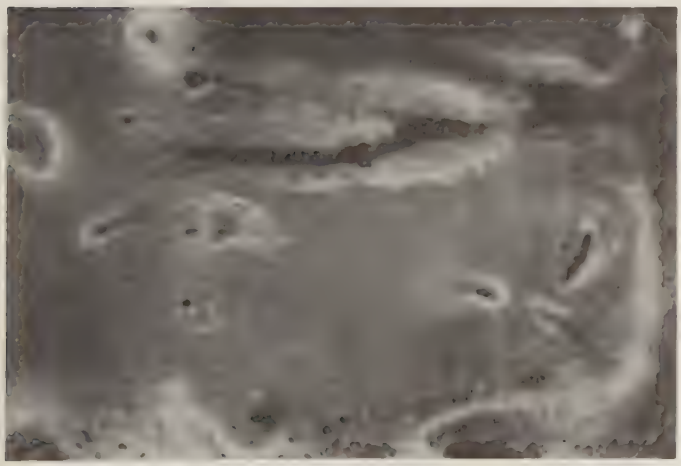


Bild 12: Devitaler Knochen mit eindringenden Gefäßen (G) (105fach)

Bild 13: Endostale Resorptionszone des Lagerknochens (67fach)

2.3. Die Tiere der Gruppe III (1 µg Flavichromin)

3. Woche:

Im Defektbereich mineralisiert die gefäßreiche Grundsubstanz nach drei Wochen. Der subperiostale Kallus zieht vom gesunden Anteil des Lagerknochens über den gesamten Defektbereich. Er wird nach drei Wochen mineralisiert, wie die Tetracyclinmarkierung anzeigt.

5. Woche:

Im Bereich des Lagerknochenrandes zeigt sich auch hier devitaler Knochen mit leeren Zellvakuolen (Bild 14). Der tote Knochen wird zum Teil von neugebildeten Gefässen durchzogen, die nach fünf Wochen Kalksalzablagerungen konzentrisch um das Gefäßlumen aufweisen.

Auf dem subperiostalen Geflechtknochen ziehen nach fünf Wochen lamelläre Bänder von der Peripherie über den Defekt (Bild 15). Die Bänder sind verdickt und begrenzen den Defekt glatt nach außen hin.

10. Woche:

Bei der Übersichtseinteilung der Präparate

erkennt man den Defektbereich an seiner hyperchromen Färbung durch das Fuchsin. Substantiell ist auch nach zehn Wochen die Manteldicke des Lagerknochens noch nicht erreicht, so daß man subperiostal eine leichte Eindellung und endostal eine Einziehung sieht (Bild 16). Der Übergangsbereich von Lagerknochen zu Ersatzgewebe ist noch klar demarkiert.

Subperiostal und endostal wird der devitale Knochen resorbiert. Dieser Vorgang ist subperiostal wesentlich ausgeprägter als endostal (Bild 17). Man erkennt auch, daß vom vitalen, subperiostalen Bereich Gefäße in den toten Knochen ziehen. Insgesamt scheint die Gefäßdichte im ganzen Knochen höher zu sein als bei den beiden vorher beschriebenen Gruppen.

Im Defektbereich zeigt der Faserknochen perivaskulär eine beginnende, lamelläre Ossifikation, die an den schmalen roten, orangenen, grünen und blauen bzw. gelben Bändern zu erkennen ist (Bild 18).

Bild 14: Devitaler Knochen mit Gefäß (K)
(150fach)

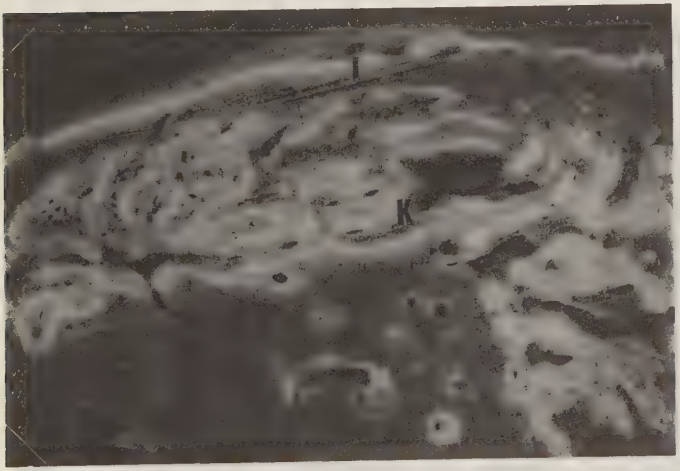


Bild 15: Lamellärer Knochen (L) deckt den subperiostalen Kallus (K) (72fach)

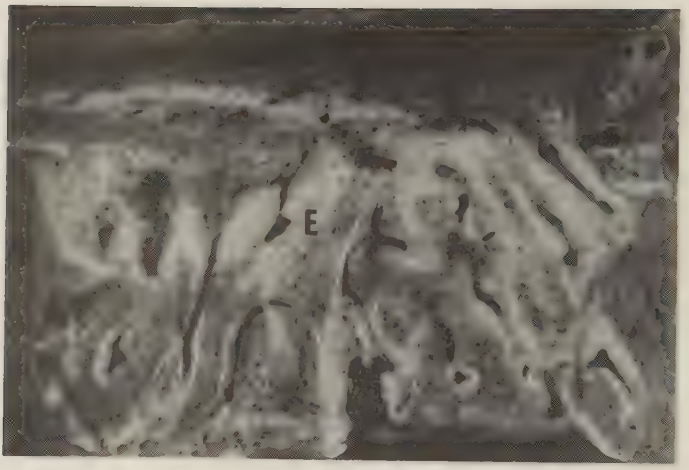


Bild 16: [illegible] der Gruppe III: (72fach)
E: Ersatzgewebe L: Lagerknochen
M: Mark

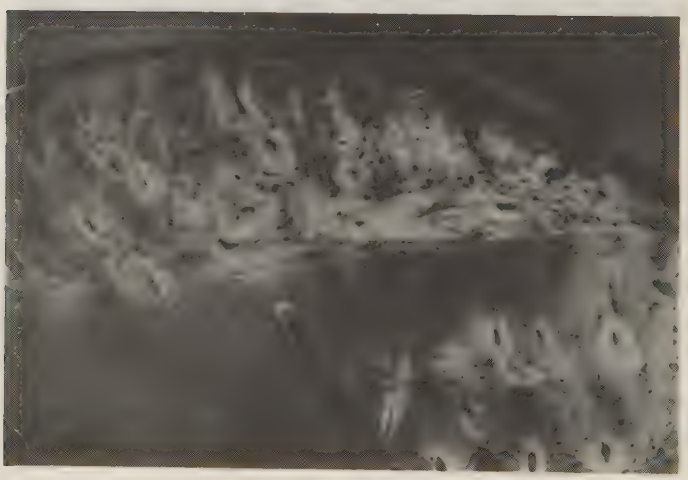


Bild 17: Subperiostaler Kallus (1[illegible]fach)

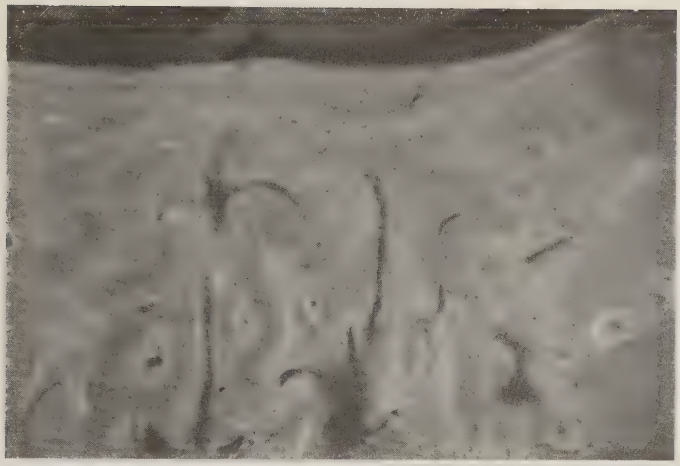


Bild 18: Beginnende, lamelläre Ossifikation
(77fach)

2.4. Die Tiere der Gruppe IV (10 µg Flavichromin)

3. Woche:

Das Ersatzgewebe im Bereich des Defektes ist stark vaskularisiert (Bild 19). Um die Gefäße erkennt man nach drei Wochen konzentrische Kalksalzablagerungen. Vom gesunden Anteil des Lagerknochens zieht in der dritten Woche ein Band subperiostalen Kallus, das in diesem Kollektiv schwach ausgeprägt ist. Es füllt gerade die Resorptionstiefe des devitalen Lagerknochens auf (Bild 20).

5. Woche:

Dem Kallus aufgelagert zieht nach fünf Wochen ein schmales Band lamellären Knochens über den gesamten Defekt. Der devitale Randbereich des Lagerknochens, den man auch in diesem Kollektiv findet, ist gut vaskularisiert (Bild 21). Konzentrisch um die Gefäße lagern sich nach fünf Wochen Kalksalze ab und beginnen mit den Revitalisierungsvorgängen des toten Knochens.

10. Woche:

Die makroskopische und mikroskopische Übersicht zeigt auch in dieser Gruppe einen hyperchromen Defektbereich. Die Manteldik-

ke des Lagerknochens ist noch nicht erreicht. Die Osteotomieränder sind exakt markiert. Die äußere Kompakta weist eine leichte Eindellung auf, die scharf begrenzt ist. Die Abgrenzung zum Mark hin ist nicht in allen Fällen genau zu erkennen (Bild 22).

Der größte Teil des devitalen Areals wurde nach zehn Wochen noch nicht revitalisiert. Man findet hier die leere Vakuolen der Osteocyten in einer homogenen, umstrukturierten Matrix. Die Randbereiche des toten Knochens zum Periost und Endost hin zeigen Resorptionsvorgänge, die subperiostal stärker ausgeprägt sind als endostal. Die konzentrischen Kalksalzablagerungen der dritten Woche werden im intervaskulären Bereich der Faserknochen durch Lamellenknochen ersetzt (Bild 23 und 24). Der gebildete, neue, lamelläre Knochen liegt noch ungeordnet zwischen den ausgerichteten Osteonen des Lagergewebes, ohne funktionellen Ansprüchen gerecht zu werden (Bild 25).

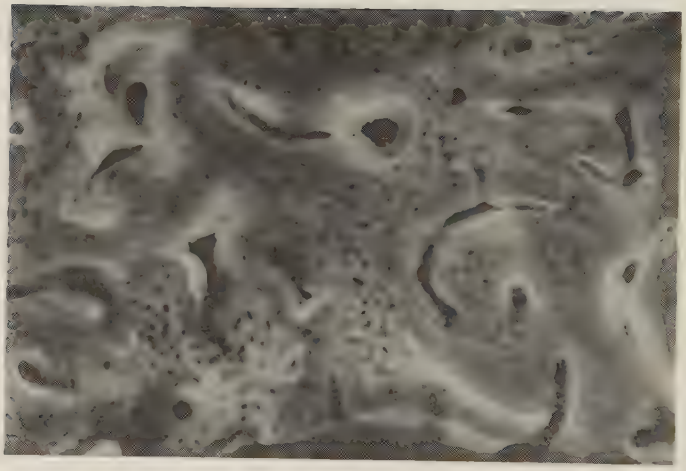


Bild 19: Stark vaskularisiertes Ersatzgewebe
(105fach)

Bild 20: Lamellärer Knochen schiebt sich endostal (E) und periostal (P) auf das Ersatzgewebe
(96fach)

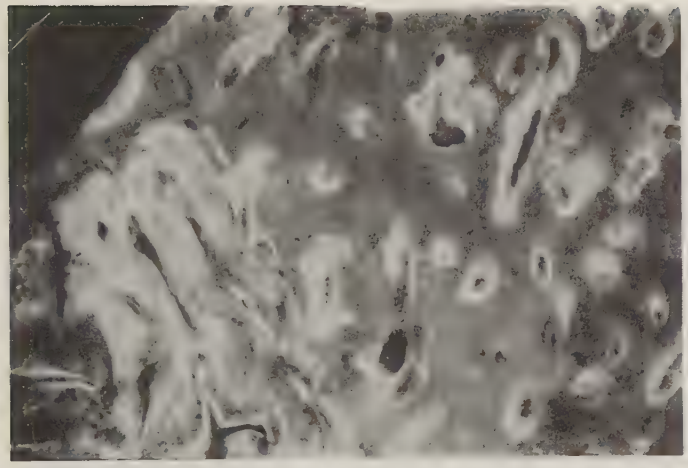


Bild 21: Starke Vaskularisierung des devitalen Knochens (77fach)

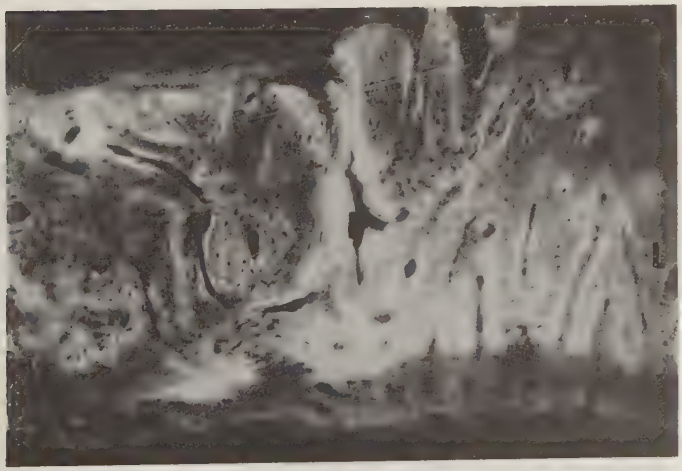


Bild 22: Übersicht der Gruppe IV: (77fach)
E: Ersatzgewebe L: Lagerknochen
M: Mark

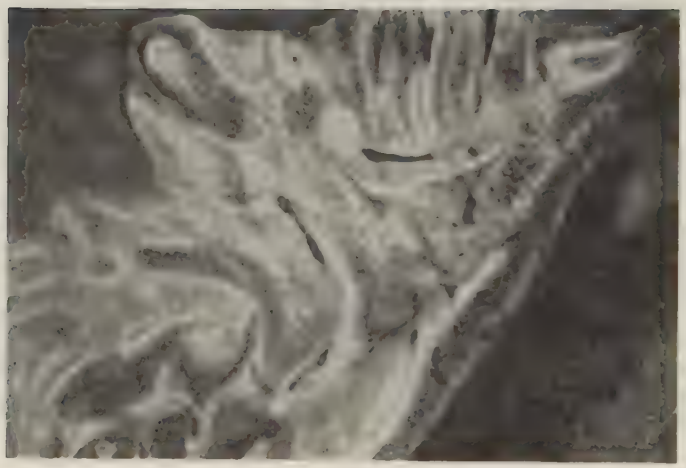


Bild 23: Lamellärer Knochen in Defektbereich
(Ziehen)

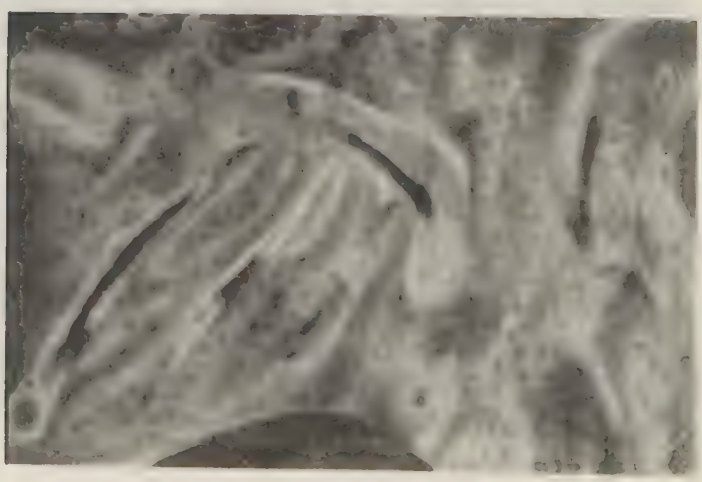


Bild 24: Lamellärer Knochen in Defektbereich
(Ziehen)

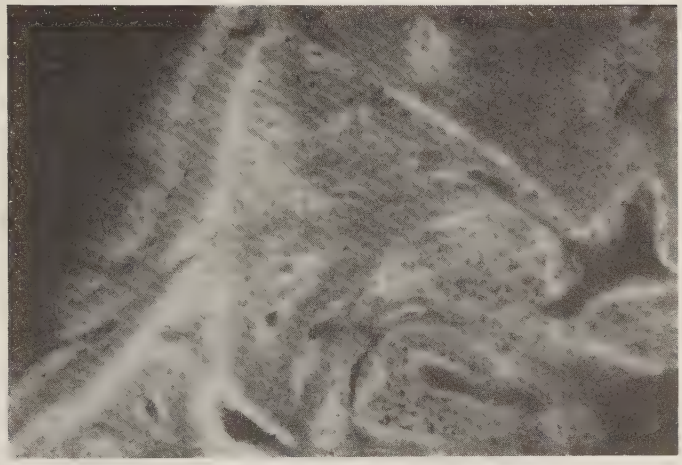


Bild 25: Lamellär aufgebauter Ersatzknochen
(96fach)

2.5. Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse der Gruppen I - IV

Nach zehn Wochen wurde in keinem Fall ein völliger Defektverschluß und, neben strukturellen Mängeln, die ursprüngliche Dicke des Lagerknochens erreicht.

Die Randzonen des Lagerknochens zeigen zu gewissen Anteilen toten Knochen auf. Dieser devitale Knochen wird zum Teil von Gefäßen durchzogen und angiogen revitalisiert. Dabei erkennt man deutlich eine verstärkte Vaskularisierung in den Kollektiven der Gruppen III (1 µg Flavichromin) und IV (10 µg Flavichromin). Ebenfalls findet in diesen beiden Gruppen die Kalksalzablagerung perivaskulär um ca. eine Woche früher statt als in den beiden Kontrollgruppen.

Es läßt sich bei den Gruppen I - III eine verstärkte, subperiostale Kallusbildung aufzeigen. Dabei entsteht ein Stützkallus, der vom gesunden Lagerknochen den gesamten Defektbereich nach zehn Wochen überzog. Auf dem faserigen Kallus bilden sich bei der Gruppe I (Kontrollgruppe) und II (NaCl-Gruppe) nach ca. sechs wochen lamelläre Schichten von neuem Knochen und bei den beiden restlichen Kollektiven nach fünf Wochen.

Das primäre Defektersatzgewebe ist ein Faserknochen, der frühestens nach drei Wochen mineralisiert wird. Bei den Tieren der Gruppe IV (10 µg Flavichromin) wurde der Faserknochen nach zehn Wochen größtenteils durch Lamellenknochen ersetzt. Man erkennt ein stark vaskularisiertes Gewebe mit perivaskulärer, lamellärer Knochenneubildung. Die lamelläre Knochenneubildung ist in den anderen Gruppen zwar auch nachweisbar, es zeigt sich jedoch, daß sich zwischen den Gefäßen noch ein großer Anteil an diffusem Faserknochen befindet. Die langsamste Entwicklung ist bei den Tieren der Gruppe II (NaCl-Gruppe) zu finden, die einen großen Anteil des Faserknochens erst nach vier Wochen mineralisieren.

V. DISKUSSION

Die anabole Wirkung des Flavichromins, die in dieser Arbeit untersucht werden soll, zeigt sich deutlich bei der Gewichtsentwicklung der vier Gruppen.

Ausgehend von den reinen Zahlenwerten nahmen die Meerschweinchen der Gruppe I mit 24,07 % am meisten an Gewicht zu, während die Tiere der Gruppe II sich mit 17,22 % am schlechtesten entwickelten. Die Gruppe I (Kontrollgruppe) und II (NaCl-Gruppe) unterschieden sich nur durch das bei der Gruppe II gesetzte Spritzentrauma. Berücksichtigt man dieses Trauma als Entwicklungshemmung, so stellt sich dies in der rechnerischen Differenz von ca. 7 % dar. Den Gruppen III (1 µg Flavichromin) und IV (10 µg Flavichromin) müßten diese 7 % zugeschlagen werden, so daß eine reelle Gewichtszunahme von ca. 28 % (21,47 % + 7 %, Gruppe III) bzw. 29 % (22,74 % + 7 %, Gruppe IV) entsteht, wodurch beide Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere Gewichtszunahme zeigen. Der anabole Charakter des Medikaments ist also gegenüber den Kontrollen deutlich erkennbar, während zwischen Gruppe III und IV (Flavichromin-Gruppen) kein signifikanter Unterschied (ca. 1,5 %) besteht.

Die chirurgische Erkrankung (traumatisch oder operativ bedingt) wird nach MOORE et al. in vier verschiedene Phasen eingeteilt:

1. Die Verletzungs- oder Operationsphase
2. Der Wendepunkt
3. Die anabole Phase
4. Die Phase des Fettansatzes

Die Operationsphase dauert nach MOORE je nach Größe des Traumas zwei bis sieben Tage. Während dieser Phase steht metabolisch ein Katabolismus im Vordergrund. In der anschließenden, anabolen Phase wird dieses Eiweißdefizit wieder ausgeglichen. Je nach Schwere des Traumas kann sich dieser Abschnitt über zehn Wochen erstrecken.

Im Gegensatz zu MOORE zeigten BROWNE et al., daß die erste Phase bis zu 45 Tagen andauern kann. Ursache für die katabole Stoffwechsellage ist neben dem Eiweißverlust durch Blutungen, eiweißreiches Exudat oder Erbrechen eine pathophysiologisch noch nicht geklärte Größe, die scheinbar auch nicht substituierbar ist.

Daneben führen Infektionen und internistische Vorerkrankungen, wie Nieren- und Lebererkrankungen, zu einem den Verlauf zusätzlich komplizierenden Eiweißverlust (CUTHBERTSON). Allgemeine Parameter des Eiweißverlustes sind Stickstoffausscheidung im Urin und Plasmaeiweißkonzentration. Nach schweren Traumen fand CUTHBERTSON, daß die Stickstoffausscheidung über die Dauer von vier bis fünf Wochen bis zu 25 g/die erreichen kann. Die Plasmaeiweißkonzentration, der zweite Parameter, zeigt innerhalb der ersten Woche eine Abnahme der Konzentration bis zu 10 g/l (THORTON).

Nicht nur in der posttraumatischen Phase scheint der Eiweißmetabolismus auf die Wundheilungstendenz im allgemeinen einen Einfluß zu nehmen. So wiesen KOSTER und Mitarbeiter an Hand eines Kollektivs von 40 Patienten mit Wundheilungsstörungen bei 42 % eine Erniedrigung des Serumproteins um 12 - 20 % nach.

Eingedenk dieser pathophysiologischen Grundlagen beschäftigte man sich schon seit Jahren damit, eine Wundheilungsbeschleunigung durch Veränderungen des Nahrungsangebotes zu erzielen. 1932 versuchten MC KEOWN et al., mit einer fettreichen Diät die Knochenheilung zu beschleunigen, was allerdings nur auf Kosten einer Verringerung der Knochenhärte zu erzielen war und wodurch die Rehabilitationsphase nicht verkürzt werden konnte.

Bereits 1919 erreichten CLARK und Mitarbeiter mit einem Eiweißüberangebot in der Nahrung eine Beschleunigung der Wundheilung. Mit einer Caseindiät (68,7 % Eiweißgehalt) haben HARVEY und HOWES eine Verkürzung der Wundheilung um 2 % oder 2 Tage unter Standardbedingungen erzielt. CHARNEY et al. verglichen Diäten mit 6 und 22 % Caseingehalt und fanden, daß nach zehn Tagen bei der 22 %-Gruppe die Zerreißfestigkeit der Wunden doppelt so hoch war wie bei der Kontrollgruppe.

Angeregt von MADDEN und WHIPPLE, die entrahmtes Milchpulver mit einem Proteingehalt von 37 % benutzten, haben BILLO durch Profilscanner- und

HERREINER durch histologische Untersuchungen im Tierversuch mit einer Tissan-Proteindiät eine signifikante Beschleunigung der Knochenheilung in Abhängigkeit vom Proteingehalt nachgewiesen.

Die Knochenheilung geht auch bei der hochprozentigen Proteindiät über die Stufe eines bindegewebigen Kallus (HERREINER). Dabei lehnt er sich OBERDAHLHOFF an, der eine absolute Ruhigstellung des Knochens fordert.

Der Kallus stellt dabei eine vom Körper hervorgerufene, physiologische Schienung des Defektbereiches dar, die je nach Belastungssituation verschiedene Größe und Ausdehnung annehmen kann.

Neben dieser sekundären Knochenheilungsform über das Zwischenstadium des Kallus erfolgt eine primäre Ossifikation nach der Druckvereinigung von Frakturfragmenten mit Osteosyntheseplatten, bei denen der Bruchspalt auf kapillare Größe komprimiert wird.

Eine primäre Reossifikation fanden wir auch im Bereich des devitalen Knochens am Rand des Lagerknochens. Als Ursache für die Devitalisierung sehen wir die thermische Überhitzung bei der Defektsetzung durch ein anscheinend ungenügend gekühltes, rotierendes Bohrinstrument an. Wir untersuchten, angeregt durch MACH, die Knochendefektregeneration unter Einfluß des anabol wirkenden Flavichromins. Dabei stellten wir fest, daß bei den Tieren der Gruppe IV eine auf das Flavichromin zu-

rückführende, verstärkte Vaskularisierung und etwa eine Woche früher einsetzende Kalksalzablagerung nachweisbar ist.

Osteoides Kallusgewebe, das von perivaskulären Osteoblasten gebildet (ALLGÖWER, SCHENK, WAGNER, WILLENEGGER) und später über Faserknochen in lamellären Knochen umgewandelt wird, zeigt sich zum ersten Mal nach zwei Wochen im Hämatom des Defektbereiches (HERREINER).

BASSET et al., wie auch ANDERSON, zeigten auf, daß bei einer ossären Defektheilung die rein angiogene Ossifikation durch Osteoblasten aus den Haverschen Kanälen den Hauptanteil an der knöchernen Wiederherstellung des Defektes leisten soll. Im Gegensatz dazu gibt HERREINER der peripheren, also der periostalen und endostalen Ossifikation das quantitative Übergewicht.

In unseren Kollektiven fanden auch wir in den Gruppen I - III ein Überwiegen der peripheren Ossifikation, während wir bei den mit 10 µg Flavichromin behandelten Tieren eine primäre, angiogene Ossifikation nachweisen konnten.

Wie wichtig der Anteil der periostalen und endostalen Knochenneubildung ist, zeigte LEXER, der nachwies, daß am völlig vom Periost entblößten Knochen die Regeneration signifikant gestört war.

Wie OBERDAHLHOFF sahen wir unabhängig von der

zu ersetzenden Knochenart Kallus vom Typ des Faserknochens, der später in lamellären Knochen umgewandelt wird. Wie oben erwähnt, fanden wir, daß bei der Gruppe IV eine Faserknochenbildung jedoch nicht sicher nachgewiesen werden konnte.

Bei Vergleich der fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigte sich klar, daß es unter der Wirkung des anabolen Medikaments Flavichromin zu einer Beschleunigung der Ossifikation um circa eine Woche kam, so daß neben der qualitativen Verbesserung durch lamellären Knochen auch eine quantitative Vermehrung des Ersatzgewebes auftrat.

Da nach zehn Wochen eine völlige Defektheilung - nach PALLASCH auch nach zwölf Wochen - noch nicht erreicht werden konnte, muß die endgültige Beurteilung der Regenerationsvorgänge weiteren Langzeitversuchen vorbehalten bleiben.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

An 100 Meerschweinchen wurde unter standardisierten Bedingungen am rechten Oberschenkel der Femur operativ freigelegt und ein künstlicher Knochendefekt gesetzt.

Die Tiere wurden in vier Gruppen à 25 Tiere eingeteilt. Eine Gruppe stellte die Kontrollgruppe dar. Zwei Gruppen erhielten täglich das anabol wirkende Flavichromin in Dosen von 1 bzw. 10 µg injiziert, die letzte Gruppe im Vergleich dazu täglich NaCl.

Die Femora wurden nach zehn Wochen histologisch aufbereitet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen konnte nach zehn Wochen der anabole Charakter des Flavichromins nicht nur im Hinblick auf die positive Gewichtsentwicklung, sondern auch durch eine beschleunigte Knochenheilung nachgewiesen werden. Es zeigte sich dabei, daß in der Gruppe mit 1 µg Flavichromin/die eine Beschleunigung der Kalksalzablagerung um etwa eine Woche nachzuweisen war. In der höher dosierten Gruppe mit 10 µg/die kam es zudem zu einer rein angiogenen Ossifikation.

Der positive Einfluß des Medikamentes Flavichromin auf die Knochenregeneration stellt eine Bereicherung in der Behandlung von Kieferbrüchen dar. Die klinische Wertigkeit sollte noch in einer Studie nachgewiesen werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abercrombie, M. — Advances in Biology of Skin: Wound Healing
Pergamon Press, New York (1964)

Allgöwer, M. — Osteosynthese und primäre Knochenheilung
Langenbecks Arch. klin. Chir. 308, 423 (1964)

Anderson, L.D. — Compression Plate Fixation and the Effect of Different Types of Internal Fixation on Fracture Healing, Introductional course lecture
American Academy of Orthopedic Surgery
J. Bone Joint Surg. 47 A, 191 (1965)

Bagby, G.W.
Janes, J.M. — The effect of compression on the rate of fracture healing using a special plate
Am. J. Surg. 95, 761 (1958)

Basset, C.A.L. — Surg. Gynec. Obst. 112, 145 (1961)

Basset, C. — Current concepts of bone formation
J. Bone Joint Surg. 44 A, 1217 (1962)

Basset, C.
Hermann, I. — Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connectiv tissue in vitro
Nature 190, 460 (1961)

Billo, H. — Untersuchungen über die Regeneration von Knochendefekten am Femur des Meerschweinchens nach vermehrter Eiweißgabe
Dissertation Würzburg (1976)

Browne, J.S.L.
Schenker, V.
Stevenson, J.A.F. — Some metabolic aspects of damage and convalescence
J. clin. Investigation 23, 932 (1944)

Charnley, J. — Positiv pressure in arthodesis of knee joint
J. Bone Joint Surg. 30 B, 478 (1948)

Clark, A.H. — The effect of diet on the healing wounds
Bull. J. Hopkins Hosp. 30, 117 (1919)

Cuthbertson, D.F. Further observations on the disturbance of metabolism caused by injury, with particular reference to the dietary requirements of fracture cases
Brit. J. Surg. 23, 505 (1936)

Duthie, R.B.
Barker, A.N. An Autoradiographic Study of Mucopolysaccharide and Phosphate Complexes in Bone Growth and Repair
J. Bone Joint Surg. 37 B, 304 (1955)

Eder, M. Pathologie des Wachstums und der Differenzierung
In:
Eder, M., Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie
Berlin (1977)

Freng, A. Subperiostal early resection of the midpalatal suture
Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. 13, 289 (1979)

Harvey, S.C.
Howes, E.L. Effect of high protein diet on the velocity of growth of fibroblasts in healing wound
Ann. Surg. 91, 641 (1930)

Herreiner, E. Histologische Untersuchungen über den Einfluß verschieden eiweißhaltiger Nahrung auf die Heilung künstlicher Knochendefekte an Meerschweinchen femora
Dissertation, Würzburg (1976)

Hoaglund, F.
Duthie, R. Fractures and Joint Injuries
In:
Schwartz, S., Principles of Surgery
New York (1974)

Koster, H.
Kasman, L.P. Relation of serum protein to well healed and to disrupted wounds
Arch. Surg. 45, 776 (1942)

Krüger, E. Lehrbuch der chirurgischen Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Bd. 2, 54
Berlin (1979)

Lexer, E. Neue deutsche Chirurgie
Bd. 26 b, Teil II, Hrsg. Enke
Stuttgart (1924)

Mach, W.J. Persönliche Mitteilungen

Madden, S.C.
Whipple, G.H. Plasma proteins, their source production and utilization
Physiol. Rev. 20, 194 (1940)

Mc Keown, R.M.
Howes, E.L.
Influence of a diet rich in Casein on the strength of bone and the healing of fractures
Arch. Surg. 29, 786 (1934)

Moore, F.
The metabolic sequence after injury
In:
The Comitee on Pre and Postoperativ Care, American College of Surgeons:
Manual of Preoperativ and Postoperativ Care, 2nd ed. 19
Philadelphia (1971)

Mulholland, J.H.
Co Tui
Wright, A.M.
Vinci, V.
Shaferoff, B.
Protein metabolism and bed sores
Ann. Surg. 118, 1015 (1943)

Müller, M.E.
Allgöwer, M.
Willenegger, H.
Technik der operativen Frakturenbehandlung
Hrsg. Springer
Berlin (1963)

Oberdahlhoff, H.
Experimentelle und klinische Studien zur Frage der Knochenregeneration
Arch. klin. Chir. 260, 109
(1948)

Oberdahlhoff, H. Zur Frage der Knochenbildung
Chirurg. 17/18, 123 (1947)

Pallasch, T.J. The healing pattern of an experimentally induced defect in the rat femur studied with tetracycline labeling
Calc. Tiss. Res. 2, 334 (1968)

Richter, J.
Neumann, A. Technische und medizinische Probleme der Ultraschall-Osteosynthese
Zentralbl. Chir. 104 (18) 1170 (1979)

Schenk, R. Zur histologischen Verarbeitung von unentkalktem Knochen
Acta anat. 60, 3 (1965)

Schenk, R.
Willenegger, H. Zum histologischen Bild der sogenannten Primärheilung der Knochenkompakta nach experimentellen Osteotomien am Hund
Experimentia 19, 539 (1962)

Schott, G.-M.
Schröder, F.
Maiwald, L. Einfluß der Nahrung auf die Frakturheilung
In:
Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie. Ein Jahrbuch, Hrsg. Karl Schuchardt
Bd. XIX, Die operative Behand-

lung der Verletzungen des Gesichtsschädels, 32 - 33
Stuttgart: Thieme (1975)

Seuffert, J. Persönliche Mitteilungen

Thornton, T.F.Jr.
Adams, W.E.
Schafer, P.W. Hypoproteinemia in thoracic surgery. A clinical study
Surg. Gynec. Obst. 79, 368 (1944)

Willenegger, H.
Perren, S.
Schenk, R. Primäre und sekundäre Knochenheilung
Chirurg. 42, 241 (1971)

Herrn Professor Schröder danke ich für die Überlassung des Themas und die großzügige Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Herrn Professor Schargus danke ich für die Übernahme des Korreferates sowie für die eingehende Betreuung bei der Erstellung der Arbeit.

L E B E N S L A U F

Name, Vorname:	Neckel, Claus Peter
Geburtsdatum, -ort:	23. März 1953 in Schweinsdorf, Kreis Rothenburg/Tauber
Eltern:	Neckel, Bruno, geb.: 15. Jan. 1924 Industriemeister
	Neckel, Sofia, geb. Schofalvi geb.: 28. Juni 1926 Kindergärtnerin
Familienstand:	Ledig

Schulen:

1959 - 63	Main Street Elementary School Columbus, Ohio, USA
1963 - 64	Oberrealschule Bayreuth
1964 - 72	Gymnasium Höchstadt - Abschluß Abitur

Hochschule:

1972 - 77	Universität Würzburg, Studium der Zahnheilkunde, Abschluß Staatsexamen
1973 - 79	Universität Würzburg, Studium der Humanmedizin, Abschluß Staatsexamen

Approbation:

02. Jan. 1978	Zahnmedizin
03. Mai 1979	Humanmedizin

Bundeswehr: 01. Okt. - 31. Dez. 1979

Seit dem 02. Jan. 1980 in der Fachausbildung zu Arzt für Kiefer- und Gesichtschirurgie an der Klinik und Poliklinik für Kieferchirurgie der Universität Würzburg.

Claus Neckel